

BAB 3

Kajian Sitologi Ke Atas Akar Primer *Zinnia elegans* Jacq. Yang Ditanam Secara *In Vivo*

3.1 TUJUAN EKSPERIMEN

Akar mempunyai pelbagai fungsi yang penting antaranya menyerap air dan garam mineral dan mensintesis bahan-bahan organik yang penting. Akar mempunyai 3 zon perkembangan yang berbeza dari segi fungsi dan struktur sel iaitu zon meristem atau zon pembahagian, zon pemanjangan dan zon pembezaan

Di dalam kajian ini bahagian hujung akar iaitu kawasan meristematik telah digunakan sebagai bahan kajian untuk memerhatikan kelakuan sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. kerana ia mengandungi bahagian yang sedang aktif membahagi. Walaupun bahagian hujung pucuk juga mengandungi kawasan meristematik tetapi ia lebih kompleks serta dilindungi oleh struktur primordia daun.

Kajian sitologi atau kelakuan sel ke atas akar primer *Zinnia elegans* Jacq. yang ditanam secara *in vivo* adalah penting untuk mendapatkan satu data piawai untuk dibuat perbandingan dengan pokok yang ditanam secara *in vitro*. Ini bertujuan untuk memastikan anak pokok yang didapati secara *in vitro* adalah serupa dengan pokok induk serta tiada berlaku variasi somaklon semasa kajian kultur tisu dijalankan.

Beberapa parameter yang biasa digunakan untuk mengkaji kelakuan sel akar adalah seperti penentuan bilangan kromosom, pengiraan Indeks Mitosis (MI), penentuan purata luas sel dan nukleus, penentuan kandungan DNA nukleus dan masa penggandaan sel (Cdt).

Indeks Mitosis (MI)

Indeks Mitosis boleh ditakrifkan sebagai bilangan sel yang sedang berada pada fasa mitosis dan dinyatakan dalam bentuk peratus berbanding dengan jumlah keseluruhan sel yang dikira. Indeks Mitosis ini tidak boleh dijadikan penunjuk untuk tempoh kitaran mitosis kerana ia tidak melibatkan pengukuran masa. Tujuan indeks mitosis ini ditentukan adalah bertujuan untuk melihat kadar pembahagian secara amnya, di mana jika peratus indeks mitosis tinggi ini bermakna mitosis berlaku dengan giatnya dan jika peratusnya rendah ini menunjukkan kadar pembahagian mitosis adalah rendah. Indeks mitosis ini juga bertujuan memastikan sel-sel *in vivo* tidak melakukan proses pembezaan semula untuk membentuk organ-organ tertentu dan tidak berlaku poliploidi hasil dari proses morfogenesis *in vitro*. Oleh itu, perbandingan boleh dibuat dengan membandingkan peratus nukleus yang berada dalam fasa mitosis pada sel akar yang ditanam secara *in vivo* dan *in vitro*.

Bilangan Kromosom

Bilangan kromosom bagi sesuatu spesies tumbuhan adalah tetap. Tumbuhan yang normal mempunyai bilangan kromosom sebanyak $2n$ atau diploid

Beberapa parameter yang biasa digunakan untuk mengkaji kelakuan sel akar adalah seperti penentuan bilangan kromosom, pengiraan Indeks Mitosis (MI), penentuan purata luas sel dan nukleus, penentuan kandungan DNA nukleus dan masa penggandaan sel (Cdt).

Indeks Mitosis (MI)

Indeks Mitosis boleh ditakrifkan sebagai bilangan sel yang sedang berada pada fasa mitosis dan dinyatakan dalam bentuk peratus berbanding dengan jumlah keseluruhan sel yang dikira. Indeks Mitosis ini tidak boleh dijadikan penunjuk untuk tempoh kitaran mitosis kerana ia tidak melibatkan pengukuran masa. Tujuan indeks mitosis ini ditentukan adalah bertujuan untuk melihat kadar pembahagian secara amnya, di mana jika peratus indeks mitosis tinggi ini bermakna mitosis berlaku dengan giatnya dan jika peratusnya rendah ini menunjukkan kadar pembahagian mitosis adalah rendah. Indeks mitosis ini juga bertujuan memastikan sel-sel *in vivo* tidak melakukan proses pembezaan semula untuk membentuk organ-organ tertentu dan tidak berlaku poliploidi hasil dari proses morfogenesis *in vitro*. Oleh itu, perbandingan boleh dibuat dengan membandingkan peratus nukleus yang berada dalam fasa mitosis pada sel akar yang ditanam secara *in vivo* dan *in vitro*.

Bilangan Kromosom

Bilangan kromosom bagi sesuatu spesies tumbuhan adalah tetap. Tumbuhan yang normal mempunyai bilangan kromosom sebanyak $2n$ atau diploid

di dalam sel-sel somatiknya. Bilangan kromosom inilah yang akan digunakan untuk memastikan tiada berlaku variasi pada tumbuhan *in vitro* berbanding dengan *in vivo*. Pemerhatian terhadap bilangan kromosom telah dilakukan kerana terdapat laporan-laporan yang mengatakan berlakunya variasi somaklon yang melibatkan perubahan pada fenotip tumbuhan serta bilangan kromosomnya seperti poliploidi, aneuploidi, kromosom 'bridge' dan fragmentasi (Partanen, 1963).

Penentuan Kandungan DNA Nukleus

Seperti bilangan kromosom, kandungan DNA nukleus bagi sesuatu spesies juga adalah tetap bagi setiap genom. Nilai C boleh digunakan untuk merujuk kepada kuantiti DNA di dalam genom haploid yang belum melalui proses replikasi. Untuk menentukan nilai C -DNA di dalam sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. satu perisian yang menggunakan alat 'Image Analysis System' telah digunakan. Alat ini menggunakan ketumpatan optik (IOD – Integrated Optical Density) untuk mengesan jumlah kandungan DNA berdasarkan intensiti pewarna Feulgen. Intensiti warna ini bergantung kepada jumlah DNA yang hadir. Sel-sel haploid, diploid atau sel-sel yang lebih tinggi ploidinya akan berbeza mengikut jumlah DNA yang hadir.

Penentuan Purata Luas Sel dan Nukleus

Alat 'Image Analyser' telah digunakan untuk mencari nilai purata luas sel dan nukleus bagi sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. Akar ini akan diwarnakan

dengan pewarna Feulgen manakala sel-sel akan diwarnakan dengan larutan 'Light Green'. Isipadu sel dan nukleus adalah bergantung kepada kandungan DNA.

Masa Penggandaan Sel (Cdt)

Kajian ini dilakukan bertujuan untuk menganggarkan jangkamasa kitaran mitosis. Masa penggandaan sel boleh ditakrifkan sebagai satu jangkamasa untuk sesuatu populasi sel itu melengkapkan satu kitaran sel dan menggandakan populasinya. Kaedah ini menggunakan larutan kolkisin di mana ia dapat memberhentikan proses mitosis pada peringkat metafasa saja tetapi tidak memberi kesan terhadap kadar kemasukan sel ke dalam proses mitosis. Dengan ini jangkamasa kitaran mitosis dapat ditentukan dengan menganggap semua sel terlibat dalam kitaran sel. Purata peratus bagi sel-sel yang memasuki proses mitosis dapat diperolehi dengan melakar satu graf peratus sel yang memasuki peringkat metafasa berbanding dengan masa perlakuan dengan larutan kolkisin. Kepekatan larutan kolkisin yang digunakan serta jangkamasa rendaman adalah penting dan mestilah sesuai untuk mengelakkan berlakunya keabnormalan mitosis. Evans *et al.* (1957) menyatakan kepekatan kolkisin yang dicadangkan adalah 0.1, 0.05 dan 0.025% (w/v) di mana pengumpulan metafasa adalah sempurna. Jangkamasa pendedahan kepada larutan kolkisin pula adalah 1-5 jam menurut Philips dan Torey (1972), atau 1-6 jam menurut Evans *et al.* (1957). Pada tempoh ini, pengumpulan metafasa adalah linear berbanding dengan masa bagi semua kawasan akar meliputi jidal akar, pusat kuisen, berkas pembuluh dan korteks.

3.2 Bahan dan Kaedah

3.2.1 Penyediaan Slaid Kekal

Beberapa biji benih *Zinnia elegans* Jacq. telah disemai di atas kapas basah yang steril dan diletak di bawah keadaan 16 jam cahaya dan 8 jam gelap. Setelah 5 hari, sebanyak 6 akar primer dengan kepanjangan (40.82 ± 15.39) diambil dan dipotong sepanjang 20 –30 mm sebelum diawet di dalam larutan 3:1 (alkohol 100%: Asid Asetik) selama 24 jam. Setelah itu, akar-akar ini akan menjalani proses hidrolisis selama 15 minit dengan menggunakan larutan 5M asid hidroklorik pada suhu bilik dan akhirnya akan diwarnakan dengan pewarna Feulgen selama 2 jam (Appendiks 1).

Hujung akar seterusnya perlu dipotong sepanjang 0.5-1.0 mm dan diletakkan di atas slaid yang bersih. Setitik larutan asid asetik 45% (v/v) dititiskan dan ditutup dengan satu sisip kaca sebelum diketuk perlahan-lahan dengan jarum untuk memecah dan meratakan sel akar tadi. Seterusnya, teknik 'squash' perlu dilakukan iaitu dengan menekan slaid dengan ibu jari untuk memastikan sel-sel dilekatkan pada slaid. Sel-sel perlu dipastikan berada dalam keadaan tidak bertindan dan sama rata. 'Dry ice' atau nama komersialnya "Freeze spray" yang mengandungi klorodiflorometana adalah satu ejen penyejuk disemburkan ke atas sisip kaca. Ini bertujuan bagi melekatkan sel-sel pada slaid. Sisip kaca perlu ditanggalkan selepas beberapa saat dengan menggunakan mata pisau. Proses terakhir bagi penyediaan slaid kekal adalah proses pencucian dan pewarnaan (Appendiks 1). Selepas itu, barulah satu sisip kaca yang bersih dan baru dilekatkan ke atas slaid dengan menggunakan DPX iaitu satu agen pelekat.

3.2.2 Penentuan Indeks Mitosis (MI)

Penentuan indeks mitosis dapat dilakukan dengan mengira jumlah bilangan sel yang sedang berada dalam fasa profasa, metafasa, anafasa dan telofasa sahaja. Sebanyak 1500 bilangan sel dikira, diambil nilai purata dan peratus secara rawak dari 3 slaid yang berbeza.

3.2.3 Bilangan kromosom

Sebanyak 15 sel pada peringkat metafasa telah dipilih untuk pengiraan bilangan kromosom dan diambil nilai puratanya. Slaid yang sama untuk pengiraan indeks mitosis telah digunakan dan kesemuanya dilihat di bawah mikroskop cahaya dengan kuasa pembesaran $\times 100$.

3.2.4 Pengukuran Kandungan DNA Nukleus

Hanya sel-sel pada peringkat interfasa sahaja boleh digunakan. Sebanyak 150 sel dari tiga slaid yang telah digunakan untuk penentuan indeks mitosis dipilih untuk pengukuran kandungan DNA nukleus. Setiap sel boleh dianalisa dengan menggunakan mikroskop cahaya (Zeiss Axioscope) yang bersambungan dengan VIDAS 21 iaitu satu sistem analisis untuk pengukuran kandungan DNA nukleus. Sel-sel yang berada pada profasa dan anafasa boleh digunakan sebagai sel-sel rujukan. Sel-sel pada peringkat interfasa telah dipilih secara rawak bagi menentukan kandungan DNA nukleus. Pada peringkat interfasa ini terdapat sel-sel

pada fasa S iaitu fasa sintesis DNA serta dua fasa lain iaitu fasa G1 (fasa prasintesis DNA) dan G2 (fasa selepas sintesis DNA).

Jumlah kandungan DNA dalam sel yang ditentukan ini adalah sebagai sel-sel data yang berdasarkan kepada sel-sel rujukan yang terdiri daripada sel-sel pada peringkat anafasa dan telofasa awal pada sel-sel hujung akar primer yang sama. Peringkat anafasa dan telofasa awal telah dipilih sebagai sel-sel rujukan kerana pada peringkat ini berlakunya pemisahan kromatid adik-beradik di mana pada akhir peringkat anafasa dua kelompok kromosom dengan jumlah kandungan DNA yang sama akan terhasil. Pada kedua-dua peringkat ini iaitu anafasa dan telofasa sel-sel akan mempunyai nilai $2C$ DNA manakala pada peringkat profasa sel-sel akan mempunyai nilai $4C$ DNA. Data-data yang diperolehi akan dianalisis di mana nukleus yang mengandungi $0 - 2.2 C$ akan berada pada fasa G1 manakala nukleus yang mengandungi $2.2 - 3.6 C$ akan berada pada fasa S, $3.6 - 4.8 C$ akan berada pada fasa G2 dan yang melebihi nilai $4.8 C$ dianggap sebagai poliploidi.

3.2.5 Pengukuran Purata Luas Sel dan Nukleus

Slaid yang telah digunakan untuk tujuan pengukuran luas sel dan nukleus adalah berlainan sedikit penyediaannya berbanding dengan 3.2.1 iaitu tiada teknik 'squash' telah dilakukan dan sel-sel diwarnakan sekali lagi dengan pewarna 'Light Green' 0.2% (w/v) selama 6 minit (Apendiks 1). Sebanyak 150 sel pada peringkat profasa telah dipilih secara rawak daripada 3 slaid yang berlainan dan dianalisa dengan menggunakan mikroskop cahaya (Zeiss Axioscope) di bawah kuasa pembesaran $\times 40$ 'oil' yang bersambungan dengan 'VIDAS Kontron Image

Analysers' iaitu satu sistem perisian yang boleh mengukur purata luas sel dan nukleus. Hanya sel-sel yang berada pada peringkat profasa saja yang boleh dipilih dan dibuat analisa.

3.2.6 Penentuan Masa Penggandaan Sel (Cdt)

Sebanyak 36 sampel akar primer yang berumur 5 hari yang disemai secara steril dengan kepanjangan ($40.82 \pm 15.39\text{mm}$) telah diambil dan dipotong sepanjang 20 –30 mm, lalu direndam dalam larutan 0.025% (w/v) kolkisin dengan jangkamasa yang berlainan iaitu selama 0, 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 jam. Selepas setiap satu perlakuan direndam, sampel akar tadi perlu diambil dan diawetkan dalam larutan 3:1 (v/v) alkohol: asid asetik. Pada setiap masa yang telah ditentukan tadi iaitu 0-6 jam hanya peringkat profasa dan metafasa sahaja yang dikira untuk penentuan peratusan sel. Data yang diperolehi, diplotkan satu graf iaitu graf peratus sel yang berada pada peringkat metafasa mengikut masa dedahan kepada kolkisin melawan masa. Daripada graf ini masa penggandaan sel dapat dikira dengan menggunakan formula $Cdt = \ln 2 / m$ di mana m ialah peratus sel pada peringkat metafasa.

Daripada eksperimen ini diandaikan bahawa semua sel yang memasuki peringkat metafasa dan profasa tidak terganggu. Untuk memastikan nilainya tetap, peratus frekuensi sel pada peringkat profasa telah dikira pada setiap masa perlakuan iaitu 0 – 6 jam. Jika peratus profasa pada setiap masa perlakuan menghampiri satu nilai yang konstan, maka nilai Cdt yang diperolehi boleh diterima.

3.3 Keputusan

Kajian sitologi telah dilakukan ke atas akar primer *Zinnia elegans* Jacq. yang berumur 5 hari dengan kepanjangan $40.82 \pm 15.39\text{mm}$. Didapati masa terbaik untuk hidrolisis akar ialah 15 minit dengan menggunakan larutan asid hidroklorik 5M pada suhu bilik $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Slaid kekal yang terhasil menunjukkan pewarnaan nukleus dengan pewarna Feulgen adalah terbaik serta pemerhatian dan pengiraannya dapat dilakukan pada semua peringkat pembahagian. Keputusan-keputusan bagi kajian sitologi seperti penentuan Indeks Mitosis (MI), kandungan DNA nukleus, bilangan kromosom, purata luas sel dan nukleus serta penentuan masa penggandaan sel adalah seperti berikut :

3.3.1 Penentuan Indeks Mitosis (MI) Ke Atas Akar Primer *Zinnia elegans* Jacq. yang Ditanam Secara *in vivo*

Penentuan nilai Indeks Mitosis boleh dilakukan dengan menggunakan formula berikut :

$$\text{MI} = \frac{\text{bilangan sel pada fasa pembahagian}}{\text{Jumlah keseluruhan sel yang dikira}} \times 100\%$$

Berdasarkan formula di atas, nilai indeks mitosis bagi sel-sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo* adalah $13.47 \pm 0.46\%$ (Jadual 3.1). Nilai purata ini diperolehi dari 1500 sel yang dipilih secara rawak dari 3 slaid yang berlainan.

3.3.2 Bilangan Kromosom

Pengiraan dan penentuan bilangan kromosom akar primer *Zinnia elegans* Jacq. agak sukar dilakukan kerana saiz sel dan nukleus yang kecil serta taburan kromosom yang tidak sekata, bertindih dan kurang jelas. Justeru itu, keputusan bilangan kromosom yang diambil nilai puratanya sahaja. Dalam kajian ini, purata bilangan kromosom bagi sel-sel akar primer yang telah ditanam secara *in vivo* adalah 22.9 iaitu menghampiri nilai 23 (Plat 3.1) dan berjulat di antara 18-28 (Jadual 3.1).

3.3.3 Kandungan DNA Nukleus

Daripada jadual taburan kandungan DNA (Jadual 3.2 dan Rajah 3.2), didapati kebanyakan sel-sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo* berada pada fasa G2 (3.6-4.8C) iaitu sebanyak 55.62%, sel-sel poliploid (>4.8C) sebanyak 33.75%, pada fasa S (2.2-3.6C) sebanyak 14.37% dan pada fasa G1 (0-2.2C) sebanyak 0%.

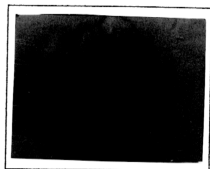
Oleh kerana peratus sel-sel yang menunjukkan poliploidi atau kandungan DNA yang melebihi 4.8C adalah tinggi iaitu 33.75% maka ia mempengaruhi bilangan kromosom pada peringkat metafasa iaitu berjulat di antara 18-28 dan nilai puratanya 22.9 iaitu menghampiri nilai 23 (Jadual 3.1).

Plat 3.1

Bilangan kromosom pada peringkat metafasa bagi sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo* iaitu $2n = 23$ dan berjulat di antara 18–28.



$2n = 28$




$2n = 18$



$2n = 23$



$2n = 24$

( 25 μ m ,100x)

3.3.4 Purata Luas Sel dan Nukleus

Berdasarkan kepada Jadual 3.3 dan Rajah 3.3 nilai purata luas sel bagi sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo* adalah $113.55 \pm 4.44 \mu\text{m}^2$ dan purata luas nukleus adalah $40.58 \pm 0.95 \mu\text{m}^2$ (Rajah 3.4). Manakala nisbah luas nukleus : sel ialah 0.39.

3.3.5 Penentuan Masa Penggandaan Sel (Cdt)

Bagi penentuan masa penggandaan sel (Cdt) pula satu graf garis lurus didapati (Rajah 3.1) dengan persamaan regresinya iaitu $Y = 0.52x + 0.93$ dan koefisien korelasi, $r = 0.93$. Dengan menggunakan formula $\text{Cdt} = \ln 2 / m$, di mana m adalah kecerunan bagi graf, masa penggandaan sel (Cdt) bagi sel-sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo* adalah 133 jam.

Jadual 3.1: Nilai purata MI, bilangan kromosom dan masa penggandaan sel bagi sel akar primer *Z. elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo*.

Purata MI \pm SE (%)	Bilangan Kromosom		Masa Penggandaan Sel (Jam)
	Julat	Purata	
13.47 \pm 0.46	18- 28	22.9	133

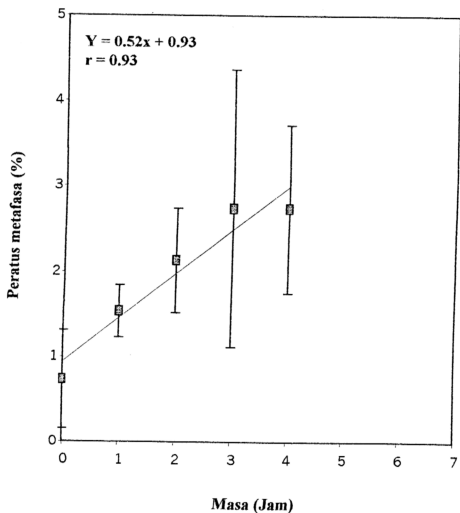
Jadual 3.2: Taburan kandungan DNA nukleus yang berada pada fasa G1, S, G2 dan yang menjadi poliploid bagi sel-sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo*.

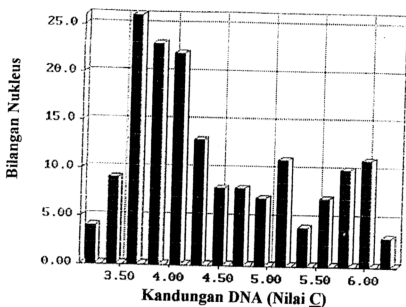
G1 (%)	S (%)	G2 (%)	Poliploid (%)
0	14.37	55.62	33.75

Jadual 3.3: Purata luas sel, luas nukleus serta nisbah luas nukleus : luas sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo*.

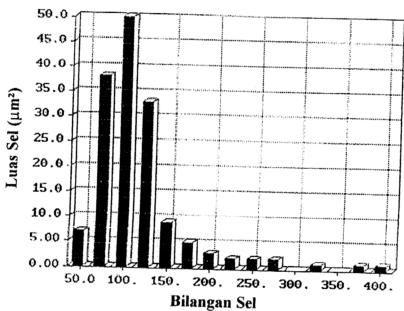
Purata Luas Sel (μm^2)	Purata Luas Nukleus (μm^2)	Nisbah Luas Nukleus : Sel
113.55 \pm 4.44	40.58 \pm 0.95	0.39

Rajah 3.1: Graf Masa Penggandaan Sel (Cdt) menunjukkan perkaitan di antara peratus metafasa berbanding dengan tempoh dedahan kepada 0.025% kolkisin bagi sel-sel akar primer *Zimmia elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo*.

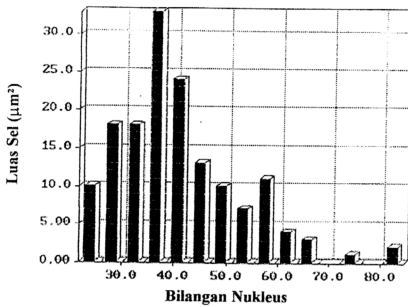




Rajah 3.2 : Taburan kandungan DNA sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo*



Rajah 3.3 : Taburan luas sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo*



Rajah 3.4 : Taburan luas nukleus sel akar primer *Z.elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo*

3.4 RINGKASAN KEPUTUSAN

1. Nilai purata Indeks Mitosis bagi sel-sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo* adalah $13.47 \pm 0.46\%$
2. Nilai purata bilangan kromosom bagi *Zinnia elegans* Jacq. dalam keadaan *in vivo* adalah 22.9 dan berjulat di antara 18 hingga 28.
3. Purata luas sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. *in vivo* adalah $113.55 \pm 4.44 \mu\text{m}^2$ dan purata luas nukleus adalah $40.58 \pm 0.95 \mu\text{m}^2$. Manakala nisbah luas nukleus : sel adalah 0.39.
4. Didapati kandungan DNA nukleus bagi sel-sel akar *Zinnia elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo* adalah sebanyak 0% pada fasa G1, terdapat 14.37% pada fasa S, 55.62% pada fasa G2 dan 33.75% sel-sel berada dalam keadaan poliploid.
5. Masa penggandaan sel (Cdt) bagi sel-sel akar primer *Zinnia elegans* Jacq. yang telah ditanam secara *in vivo* adalah 133 jam.